

平成 29 年 5 月 10 日

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research on Regenerative Medicine for Clinical Application

研究開発課題名： (日本語) ヒト iPS 細胞由来褐色脂肪細胞を用いた新規糖尿病治療薬の開発
(英語) Development of novel antidiabetic drugs by using human iPS-derived brown adipocytes

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 疾患制御研究部
室長 佐伯久美子

所属 役職 氏名： (英語) Kumiko Saeki, M.D., Ph.D., Division Chief, Department of Disease Control,
Research Institute, National Center for Global Health and Medicine,

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ヒト BA の糖代謝改善作用増強薬開発に向けたスクリーニング
開発課題名： (英語) Drug screening for intensifying the anti-diabetic effects of human
brown adipocytes

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 疾患制御研究部
部長 湯尾 明

所属 役職 氏名： (英語) Akira Yuo, M.D., Ph.D., Director, Department of Disease Control, Research
Institute, National Center for Global Health and Medicine,

分担研究 (日本語) ゲノム編集技術とウイルスフリー iPS 樹立技術を駆使した創薬スクリー
ニング系の開発と条件検討

開発課題名： (英語) Technical development for genome editing and virus-free iPS cell
establishment that are applicable to functional drug screening

研究開発分担者 (日本語) 株式会社 ID ファーマ (旧ディナベック株式会社) 主任研究員 佐伯晃一

所属 役職 氏名： (英語) Koichi Saeki, Ph.D., Senior Scientist, ID Pharma CO., Ltd.

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合

1. 代謝改善ホルモンの同定

ヒト多能性幹細胞から作製した褐色脂肪細胞（Brown adipocyte; BA）（以下、ヒト BA）が分泌する糖代謝改善ホルモンとして、我々がその存在を見出した「インスリン分泌促進因子」及び「インスリン感受性亢進因子」の分子構造を同定する。本年度は、ヒト BA の培養上清（BA-SUP）を、PD-10 カラム（GE ヘルスケアバイオサイエンス）を用いて脱塩濃縮し、これをリンガーバッファーに溶解した上で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて細分画化した。「インスリン分泌亢進因子」については、マウス膵ベータ細胞株（MIN6）に各細分画を添加してインスリン分泌量を New HTRF® High Range Insulin Assay によりハイスループットに測定した結果、特定の細分画に活性が濃縮されることを確認した。一方「インスリン感受性亢進因子」については、MIN6 に各細分画を添加してグルコース取込み量を Glucose Uptake-Glo™ Assay（プロメガ社）でハイスループットに測定した結果、上記とは別の特定の細分画に活性が濃縮されることを確認した。現在、両因子についてゲル濾過カラムにおける活性細分画を、疎水カラム及びイオン交換カラムを用いてさらに純化中である。なお、バイオリアクターを用いた「BA-SUP 大量調製」のための条件検討はすでに済ませており、今後は、複数種のカラムを用いた HPLC による純化プロトコルに則って、大量 BA-SUP を用いた純化作業を実行し、活性画分が 210 nm 吸光度で十分に高いシングルピークとして検出されることを確認した上で、質量分析装置による解析で両因子の分子構造を決定する。

2. ヒト BA 分化促進薬の開発

CRISPR/Cas9 システムを適用して BA マーカー遺伝子 ZIC1 の下流に GFP 遺伝子をノックインしたヒト多能性幹細胞株を樹立した。しかし BA 分化に伴う GFP 蛍光値の上昇は十分に高くなかったため、GFP 遺伝子をタンデムに 4 個連結した蛋白の発現ユニットのノックイン株の樹立に向けてベクター作製を開始した。同時に「分化誘導に伴う BA マーカー遺伝子のハイスループットな発現測定」に向けて、QuantiGene Assay (Affymetrix 社)による PRDM16, INHBB, Gene X の発現測定系をセットアップした。ちなみに、慢性寒冷環境では白色脂肪組織中に BA に類似した Beige 細胞が出現することが知られているが、BA と Beige の概念に関する共通見解は得られないまま論争が続いていた。しかし今年 1 月の Keystone Symposia にて、thermoneutral な環境（寒さを感じない温度、29-30°C）では BA が「Beige 選択的マーカー遺伝子群」を発現することが報告され『Beige は BA のダウングレード細胞である』という共通見解が得られた。さらに、ヒトは thermoneutral 環境で生活しているため、加齢とともに BA は減少し Beige が増加するのであろう、との見解も得られた。我々の「ヒト多能性幹細胞の BA 分化誘導系」においても、分化に伴い PRDM16 (BA/Beige 共通マーカー) と Gene X (BA マーカー) の発現は上昇するのに対して、INHBB (Beige マーカー) は発現が低下（消失）する。一方、成熟 BA を長期培養すると、PRDM16 (BA/Beige 共通マーカー) は緩やかに上昇を続けるのに対して、Gene X (BA マーカー) は発現が減少し、かつ INHBB (Beige マーカー) は発現が誘導されることを見出している。このように「成熟 BA の過培養による Beige へのダウングレード」は in vitro 培養系でも観察されており、我々の開発した BA 培養系は「ヒト成

人における加齢依存的な BA 縮退」の優れたモデルとなると考えられた。そこで本研究では、ヒト BA 分化促進薬の開発」に向けて、分化誘導を促進する薬剤（Day 10 以前の時点における PRDM16/GDF15 発現上昇と INHBB 発現阻止の効果を持つ薬剤）のみならず、成熟 BA の Beige へのダウングレードを阻止する効果のある薬剤（Day 16-22 における PRDM16/Gene X 発現維持と INHBB 誘導阻止の効果のある薬剤）もスクリーニングすることとし、現在、準備を進めている。

1. Identification of glucose metabolism-improving factors

We have discovered that brown adipocytes (BA) generated from human pluripotent stem cells secrete two kinds of glucose metabolism-improving factors: insulin secretion-enhancing factor and insulin sensitivity-upregulating factor. To determine their molecular structures, supernatants of human pluripotent stem cell-derived BA (BA-SUP) were collected, concentrated/desalted by using PD-10 column (GE healthcare) and applied to high performance liquid chromatography (HPLC). In HPLC using a gel filtration column, the insulin secretion-enhancing activity was concentrated at a specific subtraction as assessed by New HTRF® High Range Insulin Assay (Cisbio Bioassays, Codolet, France) using MIN6 murine pancreatic beta cells. On the other hand, the insulin sensitivity-upregulating activity was concentrated at another specific subtraction as assessed by Glucose Uptake-Glo™ Assay (Promega Corp, Madison, WI) using MIN6 cells. We are currently performing further subfractionation of these two activities by applying HPLC using hydrophobic columns and ion-exchanging columns. We have already determined the optimal condition for preparing BA-SUP on a large scale by using a BioReactor. When we have decided the precise protocols for purifying the two factors, we will set out on large scale purifications. As soon as we have identified the activity of interest within a single peak in 210 nm absorbance curve, we will perform the spectrometric analysis to identify the molecular structure of the glucose metabolism-improving factor of interest.

2. High-throughput drug screening assay to identify new therapeutic agents that accelerate human BA differentiation.

We established a ZIC1-GFP knock-in human pluripotent stem cell line for screening BA differentiation-enhancing agents. It was found, however, that GFP signals in BA-differentiating pluripotent stem cell spheres were considerably weak. Therefore, we constructed a new knock-in vector carrying a 4xGFP expression unit. At the same time, we set up QuantiGene Assay (Affymetrix) to quantitatively assess the expressions of PRDM16, which is a BA/Beige common marker, INHBB, which is a Beige marker, and Gene X, which is a novel BA marker. We found that PRDM16 and Gene X expressions were consistently up-regulated while INHBB expression rapidly declined during the process of BA differentiation (Day 0 - Day 10). Interestingly, when matured hBA was subjected to overtime culture (Day 16 - Day 22), INHBB expression was re-induced while Gene X expression was down-regulated. On the other hand, PRDM16 expression remained gradually up-regulated. It was recently reported that Beige cells can be

recognized as downgraded BA. Our human ES/iPS-derived BA culture system reflects the aging-associated reduction of human BA. Thus, we will perform drug screening to identify agents that contribute to not only acceleration of BA-differentiation but also quality maintenance of matured BA.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Yudasaka M, Yomogida Y, Zhang M, Tanaka T, Nakahara M, Kobayashi N, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Ishihara K, Saeki K, Kataura K. New Bio-Application of Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes in Brown Fat Imaging Reflecting Heat Productivity. Sci Report 2017, 7: 44760.
2. Kobayashi N, Nakahara M, Oka M, Saeki K. Could “Brown Adipose Tissue Failure” be a Cause of Metabolic Syndrome ? Medical Research Archive. Med Res Arch 2016, Vol 4, No 7.
3. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1 α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. Diabetes 2016, 65: 3649-3365.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト褐色脂肪細胞特異的モノクローナル抗体の作製：メタボリック症候群の新規治療開発に向けて、口頭、小林徳彦、西尾美和子、佐伯久美子、第 37 回日本肥満学会、2016/10/07, 国内
2. ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞分化誘導、口頭、小林徳彦、西尾美和子、湯尾明、佐伯久美子、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30, 国内
3. 血管内皮細胞の品質管理における microRNA の関与、口頭、中原正子、小林徳彦、岡雅、湯尾明、佐伯久美子、第 16 回再生医療学会、2017/03/08, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞の作製—糖代謝異常の治療開発に向けて—、佐伯久美子、AdipoScience in Hiroshima 3rd, 2017/2/24, 国内

(4) 特許出願